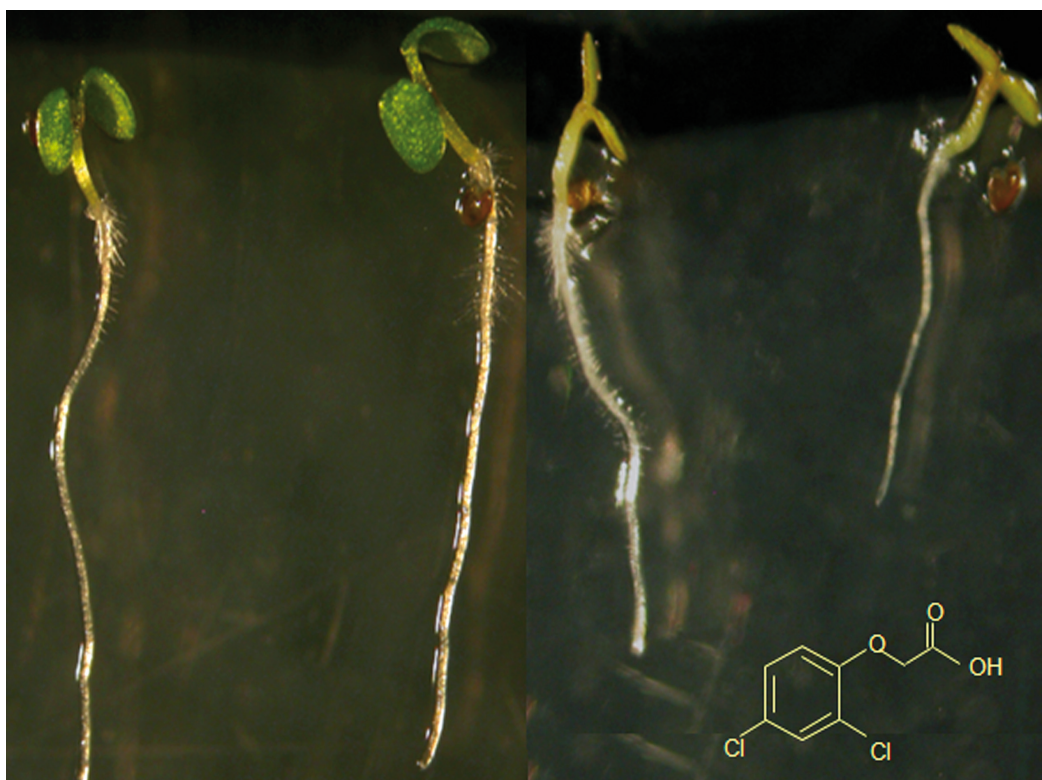


**Resíduo de ácido 2,4-diclorofenóxi-acético  
em vidrarias de cultura de tecidos:  
efeitos sobre o cultivo de plantas in vitro  
e desenvolvimento de um protocolo  
para descontaminação**





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Uva e Vinho  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 17***

**Resíduo de ácido 2,4-diclorofenóxi-acético  
em vidrarias de cultura de tecidos:  
efeitos sobre o cultivo de plantas in vitro  
e desenvolvimento de um protocolo  
para descontaminação**

Iraci Sinski  
Daniela Dal Bosco  
Vera Quecini

Embrapa Uva e Vinho  
Bento Gonçalves, RS  
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Uva e Vinho**

Rua Livramento, 515  
95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil  
Caixa Postal 130  
Fone: (0xx)54 3455-8000  
Fax: (0xx)54 3451-2792  
<http://www.cnpuv.embrapa.br>  
[sac@cnpuv.embrapa.br](mailto:sac@cnpuv.embrapa.br)

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Mauro Celso Zanus*

Secretária-Executiva: *Sandra de Souza Sebben*

Membros: *Alexandre Hoffmann, César Luís Girardi, Flávio Bello Fialho, Henrique Pessoa dos Santos, Kátia Midori Hiwatashi e Viviane Zanella Bello Fialho*

Formatação e editoração gráfica: *Alessandra Russi*

Foto da capa: *Elaborada pelos autores*

**1ª edição**

1ª impressão (2012): 250 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Uva e Vinho

---

Sinski, Iraci

Resíduo de ácido 2,4-diclorofenóxi-acético em vidrarias de cultura de tecidos: efeitos sobre o cultivo de plantas in vitro e desenvolvimento de um protocolo para descontaminação / por Iraci Sinski, Daniela Dal Bosco e Vera Quecini -- Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, 2012.

21 p. : il., color. -- (Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento / Embrapa Uva e Vinho, ISSN 1981-1004 ; 17).

1. Laboratório. 2. Método. 3. Contaminação. 4. Herbicida. 5. Auxina. I. Dal Bosco, Daniela. II. Quecini, Vera. III. Título. IV. Série.

---

CDD 542.1 (21. ed.)

---

©Embrapa 2012

# Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>9</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>12</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>13</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>16</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>16</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>20</b>



# Resíduo de ácido 2,4-diclorofenóxi-acético em vidrarias de cultura de tecidos: efeitos sobre o cultivo de plantas in vitro e desenvolvimento de um protocolo para descontaminação

---

*Iraci Sinski<sup>1</sup>*  
*Daniela Dal Bosco<sup>1</sup>*  
*Vera Quecini<sup>2</sup>*

## Resumo

Os estudos de desenvolvimento vegetal e o emprego de metodologias para a engenharia genética frequentemente requerem a indução de células somáticas quiescentes à recuperação de seu potencial embriogênico pela aplicação de análogos sintéticos do hormônio vegetal auxina. Devido aos efeitos severos que os análogos de hormônios causam sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, esses compostos têm sido empregados como herbicidas na agricultura. As aplicações em larga escala desses compostos demonstraram seu potencial deletério como contaminante da água e do solo, estando associados ao aumento na frequência de tumores malignos em seres humanos. Os efeitos da contaminação de vidrarias de laboratório de cultura de tecidos por resíduos de ácido 2,4-diclorofenóxi-acético (2,4-D) sobre o desenvolvimento de três espécies vegetais foram investigados. A presença de resíduos de 2,4-D reduziu severamente a germinação de sementes, estabelecimento de plântulas e desenvolvimento da parte aérea e radicular das espécies vegetais testadas: *Arabidopsis thaliana*, *Petunia x hybrida* e *Solanum lycopersicum*. Com base nas recomendações internacionais para o gerenciamento de resíduos de herbicidas do grupo clorofenóxi, foi desenvolvido um protocolo simples e executável para a descontaminação de plásticos e vidrarias de laboratório. A eficiência do protocolo de descontaminação foi avaliada por análises in vivo do crescimento e desenvolvimento vegetal em meio de cultura livre de reguladores de crescimento em recipientes contaminados, descontaminados e novos. Os parâmetros investigados de desenvolvimento de plantas cultivadas em recipientes descontaminados foram semelhantes àqueles observados para plantas crescidas em vidraria nova, indicando redução significativa da contaminação.

**Palavras-chave:** auxina, contaminação, herbicida, embriogênese somática.

---

<sup>1</sup> *Biólogo, Assistente de Pesquisa, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000, Bento Gonçalves, RS. E-mails: iraci@cnpuv.embrapa.br; daniela@cnpuv.embrapa.br.*

<sup>2</sup> *Eng. Agr., Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000, Bento Gonçalves, RS. E-mail: vera@cnpuv.embrapa.br.*





# Resíduo de ácido 2,4-diclorofenóxi-acético em vidrarias de cultura de tecidos: efeitos sobre o cultivo de plantas in vitro e desenvolvimento de um protocolo para descontaminação

---

*Iraci Sinski<sup>1</sup>*  
*Daniela Dal Bosco<sup>1</sup>*  
*Vera Quecini<sup>2</sup>*

## Abstract

Plant development and gene transfer studies frequently require the induction of quiescent somatic cells to recuperate embryogenic potential via application of synthetic auxin analogs. The severe effects of hormone analogs on plant growth and development have prompted their use as herbicides in agriculture, where they were demonstrated to be deleterious contaminants to soil and water, also associated to increased frequencies of certain human tumors. In order to investigate the effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) contamination in plant tissue-culture laboratories, the development of three plant species was investigated on contaminated and hormone-free glassware. Residual 2,4-D severely impaired seed germination, seedling establishment and aerial and root development of the tested plant species, namely; *Arabidopsis thaliana*, *Petunia x hybrida* and *Solanum lycopersicum*. A simple and feasible decontamination protocol for laboratory plastic and glassware was developed, based on international recommendations for handling chlorophenoxy herbicide residues. The effectiveness of the decontamination procedure was assayed by in vivo analyses of plant growth and development on hormone-free media contained in contaminated, decontaminated and new glassware. Plant development parameters evaluated on decontaminated glassware were indistinguishable from those observed in plants grown on new plates, indicating that hormone contamination was significantly reduced.

**Key words:** auxin, contamination, herbicide, somatic embryogenesis.

---

<sup>1</sup> *Biólogo, Assistente de Pesquisa, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000, Bento Gonçalves, RS. E-mails: iraci@cnpuv.embrapa.br; daniela@cnpuv.embrapa.br.*

<sup>2</sup> *Eng. Agr., Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000, Bento Gonçalves, RS. E-mail: vera@cnpuv.embrapa.br.*



## Introdução

O hormônio vegetal auxina está envolvido no controle de vários processos biológicos, tais como embriogênese, organogênese, manutenção do meristema radicular, diferenciação do tecido vascular, crescimento do hipocótilo, alongação da raiz, formação do gancho apical, dominância apical, amadurecimento de frutos, crescimento em resposta aos estímulos do ambiente, resposta a baixas temperaturas, entre outros (RAHMAN, 2012; VANSTRAELEN; BENKOVÁ, 2012; DUCLERCQ et al., 2011; ZHAO, 2010). A forma predominante de auxina encontrada naturalmente nas plantas é o ácido indol-3-acético (AIA) e a caracterização química da molécula endógena permitiu o desenvolvimento de análogos sintéticos, tais como o ácido 1-naftilacético (1-ANA) e o ácido 2,4-diclorofenóxi-acético (2,4-D), empregados com frequência em estudos genéticos e fisiológicos (ESTELLE; SOMMERVILLE, 1987; SAVALDI-GOLDSTEIN et al., 2008) e como herbicidas (PAZMIÑO et al., 2012).

Na cultura de tecidos vegetais, células somáticas mitoticamente quiescentes podem ser induzidas a recuperar seu potencial embriogênico e se diferenciar em embriões viáveis. O processo envolve uma reprogramação extensiva dos padrões de expressão gênica e leva à formação de estruturas bipolares, desenvolvidas sem a fusão de gametas sexuais, e denominadas embriões somáticos. A embriogênese somática (ES) constitui um sistema modelo importante para a investigação de processos do desenvolvimento vegetal (FENG et al., 2010; BRAYBROOK; HARADA, 2008; NAMASIVAYAM, 2007) e para a geração de tecidos alvo adequados às tecnologias de transferência de genes (ARIAS et al., 2006). A embriogênese somática pode ser induzida em várias espécies vegetais pelo cultivo de tecidos responsivos em meio contendo auxinas, frequentemente 2,4-D, seguida de transferência subsequente para cultivo na ausência de hormônios (RAGHAVAN, 2004).

Em geral, as concentrações de 2,4-D usadas em cultura de tecidos de plantas variam de 4,5  $\mu$ M a 45 mM (BEYL, 1999). Assim, o trabalho de rotina empregando esse análogo de auxina, em laboratórios de cultura de tecidos, gera uma quantidade considerável de resíduo contendo 2,4-D, incluindo descarte de meios sólidos e líquidos, vidraria e plásticos contaminados.

Embora, os efeitos de resíduos de cultura de tecidos contendo 2,4-D sejam desconhecidos, o seu uso como herbicida está associado à redução significativa da estabilidade funcional dos solos (BÉCAERT et al., 2006), alterações de comunidades microbianas aquáticas (SURA et al., 2012) e aumento na frequência de determinados tumores malignos em seres humanos (HARDELL, 2008).

No presente estudo, foram investigadas as consequências da contaminação por 2,4-D em vidrarias empregadas em cultura de tecidos vegetais sobre o crescimento e desenvolvimento de três espécies de plantas: *Arabidopsis thaliana*, *Petunia x hybrida* e *Solanum lycopersicum* (DAL BOSCO et al., 2010). Em seguida, foi desenvolvido um protocolo de descontaminação do hormônio para vidraria e plásticos de laboratório (DAL BOSCO et al., 2010). A eficiência do protocolo foi confirmada pela redução do impacto da contaminação do análogo sintético sobre o crescimento vegetal, determinada por análises in vivo.

## Material e Métodos

O material vegetal usado no presente estudo consistiu de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia (Col-0), *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom e *Petunia x hybrida* cv. Mitchell Diploid, gentilmente cedido pelo *Arabidopsis* Biological Resource Center, ABRC (Ohio State University, Estados Unidos); Prof. Dr. Lázaro E. P. Peres (ESALQ, Universidade de São Paulo) e Prof. Dr. David G. Clark (University of Florida, Estados Unidos), respectivamente.

As sementes foram superficialmente desinfetadas por lavagem com etanol 70% (v/v) por aproximadamente 1 minuto, seguida de imersão por 20 minutos em solução contendo 1,25% (p/v) de cloro ativo, suplementada com 20  $\mu\text{L}$  de Tween 20 por 100 mL, seguida de três lavagens com água autoclavada. A seguir as sementes foram secas em papel-filtro esterilizado e posicionadas em linha em placas de Petri contendo metade dos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 15  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar, denominado 0,5 MS, com pH ajustado para 5,8 com solução 1 N de NaOH antes da autoclavagem. As sementes de *Arabidopsis* foram estratificadas por 48 horas a 4°C. As plantas foram cultivadas sob condições controladas, consistindo de fotoperíodo de 16 horas e temperatura média de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Os níveis de contaminação foram estimados pela comparação do comprimento das raízes de plântulas de *Arabidopsis* 10 dias após a semeadura (DAS), em meio 0,5 MS vertido em placas utilizadas com 2,4-D, em comparação com o comprimento das raízes de plântulas cultivadas no mesmo meio suplementado com 0,45  $\mu\text{M}$ , 0,90  $\mu\text{M}$ , 1,8  $\mu\text{M}$  e 3,6  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, em placas novas. O nível de contaminação das placas usadas com o fitormônio foi estimado em aproximadamente 0,75  $\mu\text{M}$ , conforme a atividade biológica de resíduos do hormônio sobre as plântulas de *Arabidopsis* aos 10 DAS.

O efeito residual de 2,4-D foi investigado sobre a germinação de sementes, estabelecimento de plântulas e crescimento radicular empregando placas de Petri utilizadas com o fitormônio (2,4-D), placas novas livres de resíduos (Clean) e placas descontaminadas (Decontamin) pelo protocolo elaborado. A germinação de sementes foi avaliada quatro, seis, oito e 10 dias após semeadura (DAS). O comprimento da raiz e a massa cotiledonar foram analisados aos 10 DAS. As medidas de comprimento do hipocótilo e raiz foram obtidas a partir de imagens digitais das plantas nas placas de Petri empregando o programa ImageJ (ABRAMOFF et al., 2004; RASBAND, 2009).

A partir de recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1978), foi desenvolvido um procedimento para a descontaminação de resíduos de 2,4-D que consiste na imersão completa de vidrarias e consumíveis plásticos de laboratório em uma solução 5,0% (p/v) de NaOH, por um período mínimo de 16 horas (DAL BOSCO et al., 2010). Após a descontaminação, o material tratado foi lavado com detergente comercial, enxaguado abundantemente com água e seco a 55°C por circulação forçada de ar. O mesmo procedimento de lavagem foi empregado para vidraria descontaminada e nova, livre de contaminação com 2,4-D.

Os experimentos foram conduzidos como blocos casualizados com quatro repetições, consistindo de cinco plantas por placa de Petri. Os dados foram analisados empregando o Statistical Analysis System (SAS® para Windows, versão 8.2).

## Resultados e Discussão

O uso intensivo de vidraria e plásticos de laboratório com meios de cultura contendo até  $4,5 \mu\text{M}$  de 2,4-D para a embriogênese somática de materiais de videira (VIDAL et al., 2009; IOCCO et al., 2001) durante três anos consecutivos promoveu o acúmulo de mais de 100 kg de resíduo semi-sólido contaminado por 2,4-D (Figura 1). A análise da atividade biológica do fitormônio na vidraria empregada demonstrou acúmulo de resíduos da ordem de 70,4% da concentração total de hormônio empregada para a indução da embriogênese somática, mesmo após os procedimentos de rotina de lavagem com detergente comercial (Figura 2).

O hormônio 2,4-D residual na vidraria do laboratório afetou o desenvolvimento e o crescimento de plantas das três espécies investigadas, como demonstrado nas Figuras 2, 3, 4 e 5. A germinação de sementes das duas espécies Solanaceae foi drasticamente afetada pela presença de 2,4-D residual nas placas, levando à redução de 27% para petúnia e 20% para tomate (Figuras 2 e 3). Embora não haja informações para petúnia, *Solanum lycopersicum* (tomate) é considerada uma das espécies cultivadas mais susceptíveis a 2,4-D, inclusive a doses subletais provenientes de deriva na aplicação por pulverização (FAGLIARI et al., 2005). Em calos de outras espécies de solanáceas, como a batata, a integridade celular é comprometida na presença de 2,4-D, enquanto que a ação de outros fitormônios de atividade herbicida, como ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico (dicamba) e dicloreto 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio (paraquat), induz efeitos não significativos ou não afeta a integridade celular, respectivamente (PEIXOTO et al., 2008).

Ao contrário dos efeitos observados em solanáceas, a germinação de *Arabidopsis* não foi significativamente afetada na presença da auxina sintética residual, embora uma redução na

Foto: Iraci Sinski.



Fig. 1. Resíduo sólido (plásticos) e semi-sólido (meios de cultura) contendo 2,4-D, acondicionado em sacos plásticos para incineração por empresa especializada, gerado pelo Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Uva e Vinho, em aproximadamente 36 meses.



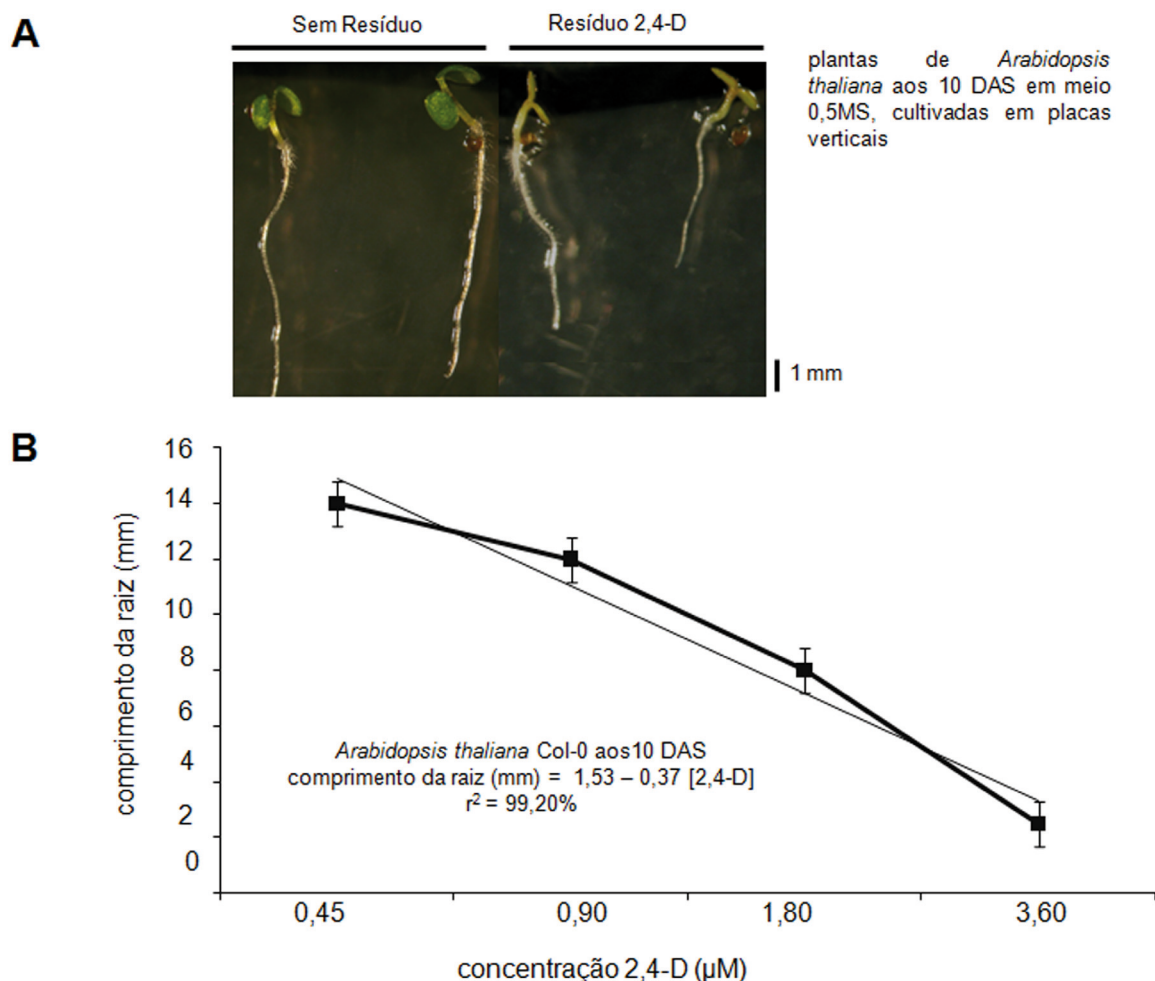


Fig. 2. Estimativa dos níveis de contaminação na vidraria de laboratório por análise de interpolação entre o comprimento da raiz de plântulas de *Arabidopsis* 10 dias após a semeadura (DAS) e concentrações conhecidas de auxina sintética 2,4-D. (A) Aspecto de plantas cultivadas em placas novas (sem resíduo) e placas usadas constantemente com 2,4-D (resíduo 2,4-D) e (B) redução do comprimento radicular em função da concentração de 2,4-D. A regressão linear foi obtida para o comprimento das raízes de plantas de *A. thaliana* em meio MS suplementado com concentrações determinadas de 2,4-D.

taxa de germinação tenha sido observada (Figura 3). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi demonstrado que um gene que codifica um transportador transmembrana da família *MultiDrug Resistance* (MDR), membro da superfamília de facilitadores principais (*Major Facilitator Superfamily*, MFS), denominado *TPO1*, confere resistência ao 2,4-D, sendo transcricionalmente ativado em resposta ao fitormônio (SIMÕES et al., 2003). Mais recentemente, a expressão heteróloga funcional de um homólogo de *TPO1* de *Arabidopsis* aumentou a resistência de células de levedura ao 2,4-D pela redução da concentração intracelular do hormônio (CABRITO et al., 2009). Essas observações sugerem que *Arabidopsis* possui a estrutura genética para tolerar concentrações baixas de 2,4-D.

Os processos de desenvolvimento pós-germinação também foram afetados por resíduos do hormônio, como observado nas Figuras 4 e 5. A biomassa dos cotilédones de tomate foi reduzida aproximadamente à metade, pela presença de 2,4-D residual (Figura 4A), enquanto que em petúnia, a massa dos cotilédones foi reduzida em 13% na presença de resíduos do hormônio (Figura 4B). Em *Arabidopsis*, a biomassa dos cotilédones não foi significativamente reduzida devido ao 2,4-D residual (Figura 4C), embora reduções no teor de clorofila sejam visíveis (Figura 2A). Em contraste, os comprimentos do hipocótilo e da raiz (Figuras 4 e 5) foram afetados pela auxina sintética residual nas três espécies investigadas. Os efeitos mais drásticos para o comprimento do hipocótilo foram observados em tomate, com uma redução de aproximadamente 40% (Figura 4A). Para o

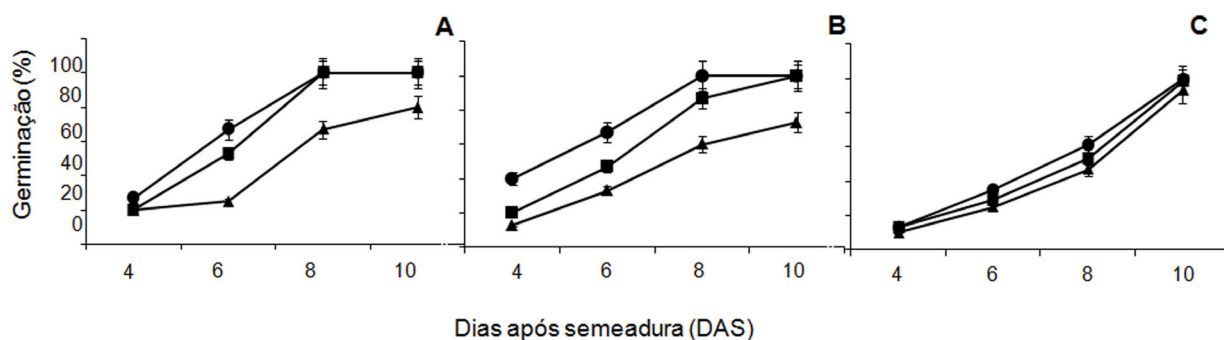


Fig. 3. Efeito do 2,4-D residual sobre a germinação de sementes de tomate (A), petúnia (B) e *Arabidopsis* (C). Os dados representam as médias de plantas germinadas aos quarto, sexto, oitavo e décimo dia após a semeadura (DAS), obtidas para quatro repetições consistindo de cinco plantas por placa de Petri. As barras de erro representam o desvio padrão. Placas sem resíduo (novas) correspondem às linhas com marcadores círculo (●), a porcentagem de germinação em placas descontaminadas corresponde à linha com marcadores quadrado (■) e placas com resíduo de 2,4-D, estão representadas pelo marcador triângulo (▲).

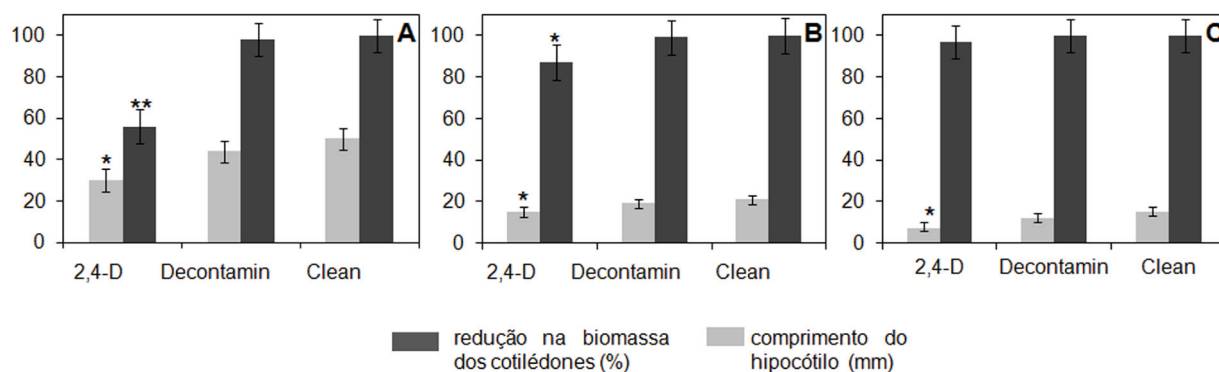


Fig. 4. Efeito do 2,4-D residual no estabelecimento de plântulas representado pelo comprimento do hipocótilo e redução da massa cotiledonar (%) aos 10 dias após a semeadura (DAS) para tomate (A), petúnia (B) e *Arabidopsis* (C). Os dados representam as medidas médias de quatro repetições consistindo de cinco plantas por placa de Petri. As barras de erro representam o desvio padrão. A descrição da vidraria utilizada está disponível no item Material e Métodos. Resumidamente, placas de Petri utilizadas com o fitormônio estão identificadas como 2,4-D; placas novas livres de resíduos, como Clean; e placas descontaminadas pelo protocolo elaborado, como Decontamin. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas para o teste t de Student a  $P < 0,5$  e  $P < 0,01$ .

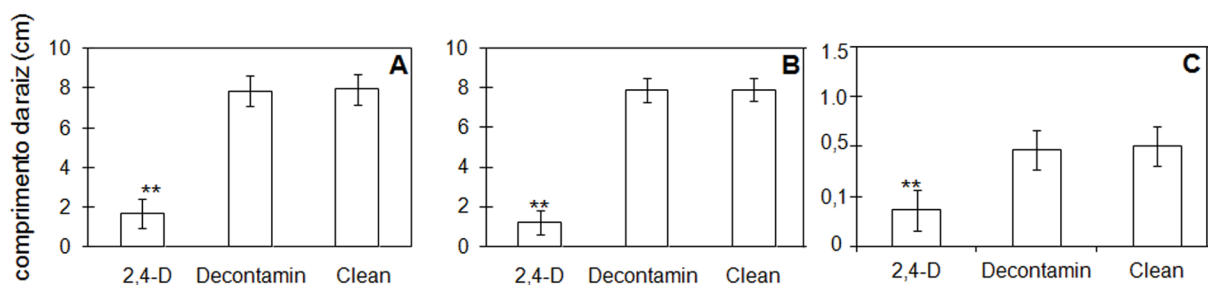


Fig. 5. Efeito do 2,4-D residual sobre o crescimento radicular a 10 dias após a semeadura (DAS) para tomate (A), petúnia (B) e *Arabidopsis* (C). Os dados representam as medidas médias de quatro repetições, consistindo de cinco plantas por placa de Petri. A descrição da vidraria utilizada está disponível no item Material e Métodos. Resumidamente, placas de Petri utilizadas com o fitormônio estão identificadas como 2,4-D; placas novas livres de resíduos, como Clean; e placas descontaminadas pelo protocolo elaborado, como Decontamin. As barras de erro representam o desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas para o teste t de Student a  $P < 0,5$  e  $P < 0,01$ .

crescimento de raízes, os efeitos inibitórios mais drásticos foram observados em petúnia, onde a presença de 2,4-D levou a uma redução de 22,5% no comprimento das raízes (Figura 5B). Os efeitos da presença de 2,4-D residual são semelhantes àqueles relatados para a aplicação de auxina exógena em plântulas cultivadas na luz (HANSON; TREWAVAS, 1982).

Considerações ambientais e de saúde com relação ao uso de herbicidas desenvolvidos a partir de 2,4-D, juntamente às descrições de sua atividade carcinogênica em humanos, favoreceram a recomendação da Organização Mundial de Saúde para a utilização de um processo de descontaminação para equipamentos de manuseio e aplicação do composto (WHO, 1978). O processo de descontaminação foi adaptado e sua eficiência foi testada para a remoção de 2,4-D residual de vidraria e material plástico usados em laboratório. O protocolo, esquematicamente representado nas Figuras 6 e 7, consiste na completa imersão do material contaminado em uma solução 5% (p/v) de NaOH por, pelo menos, 16 horas, seguida de procedimentos rotineiros de lavagem e secagem para vidraria e materiais plásticos utilizados em cultura de tecidos. O emprego do protocolo de descontaminação restaurou os parâmetros de desenvolvimento investigados a níveis semelhantes àqueles observados em plantas cultivadas na ausência de 2,4-D em vidraria nova (Figuras 2, 3, 4 e 5). Um leve efeito residual da auxina sintética foi detectável para a germinação de sementes de tomate e petúnia em vidraria descontaminada (Figura 3) e para o comprimento de hipocótilos de tomate (Figura 4). O procedimento de descontaminação restaurou completamente o fenótipo de crescimento da raiz para as três espécies testadas (Figura 5).

## **Conclusões**

Os resultados demonstraram que o uso intenso de vidraria de laboratório com meio de cultura contendo a auxina sintética 2,4-D causa contaminação residual, responsável por alterações no crescimento e desenvolvimento das plantas de forma semelhante à aplicação exógena do fitormônio. A imersão completa do material contaminado em uma solução 5% (p/v) de NaOH por, pelo menos, 16 horas, seguida de procedimentos rotineiros de lavagem de vidraria de laboratório de cultura de tecidos, reduziu a contaminação a níveis incapazes de alterar o crescimento e desenvolvimento vegetal.

## **Agradecimentos**

À Embrapa, pelo apoio financeiro às pesquisas do laboratório de cultura de tecidos e ao CNPq pela bolsa de produtividade científica.



## **Detalhamento dos Protocolos de Descontaminação**

**Devido à associação entre a exposição ao 2,4-D e o aumento na frequência de determinados tumores em seres humanos e ao caráter alcalino do hidróxido de sódio, o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) e coletiva (EPC) é recomendado para os procedimentos de descontaminação.**

### **A. Descontaminação de meios de cultura (Figura 6)**

1. Remover o meio de cultura contendo 2,4-D de placas, frascos ou tubos com auxílio de espátula, transferindo o conteúdo para recipiente de vidro ou plástico polipropileno (PP) com tampa;
2. Calcular o volume total de meio transferido. Por exemplo: 60 placas com 25 mL de meio totalizam 1,5 L de meio (0,25 L x 60 placas);
3. Pesar a quantidade de NaOH para uma solução final 5% (p/v) no volume total de meio.  
Por exemplo: para 1,5 L de meio será necessário usar 75 g de NaOH;  
\*\* Caso utilize hidróxido de sódio (NaOH) para uso doméstico, a quantidade necessária para a descontaminação deverá ser corrigida de acordo com a pureza do produto comercial. Por exemplo: para um produto para uso doméstico com 87% de pureza, será necessário empregar 84,75 g para descontaminar 1,5 L de meio;
4. Adicionar cuidadosa e lentamente o NaOH ao meio, em capela de exaustão;  
\*\* O meio adicionado de 5% (p/v) de NaOH torna-se líquido e com pH alcalino (próximo de 12);
5. Tampar o recipiente e incubar a temperatura ambiente por, pelo menos, 16 horas;
6. Após o período de incubação, medir o pH e acrescentar lentamente solução HCl 5 N até o pH final próximo de 7,0;
7. Após a neutralização do pH, o meio pode ser descartado como resíduo orgânico inerte.

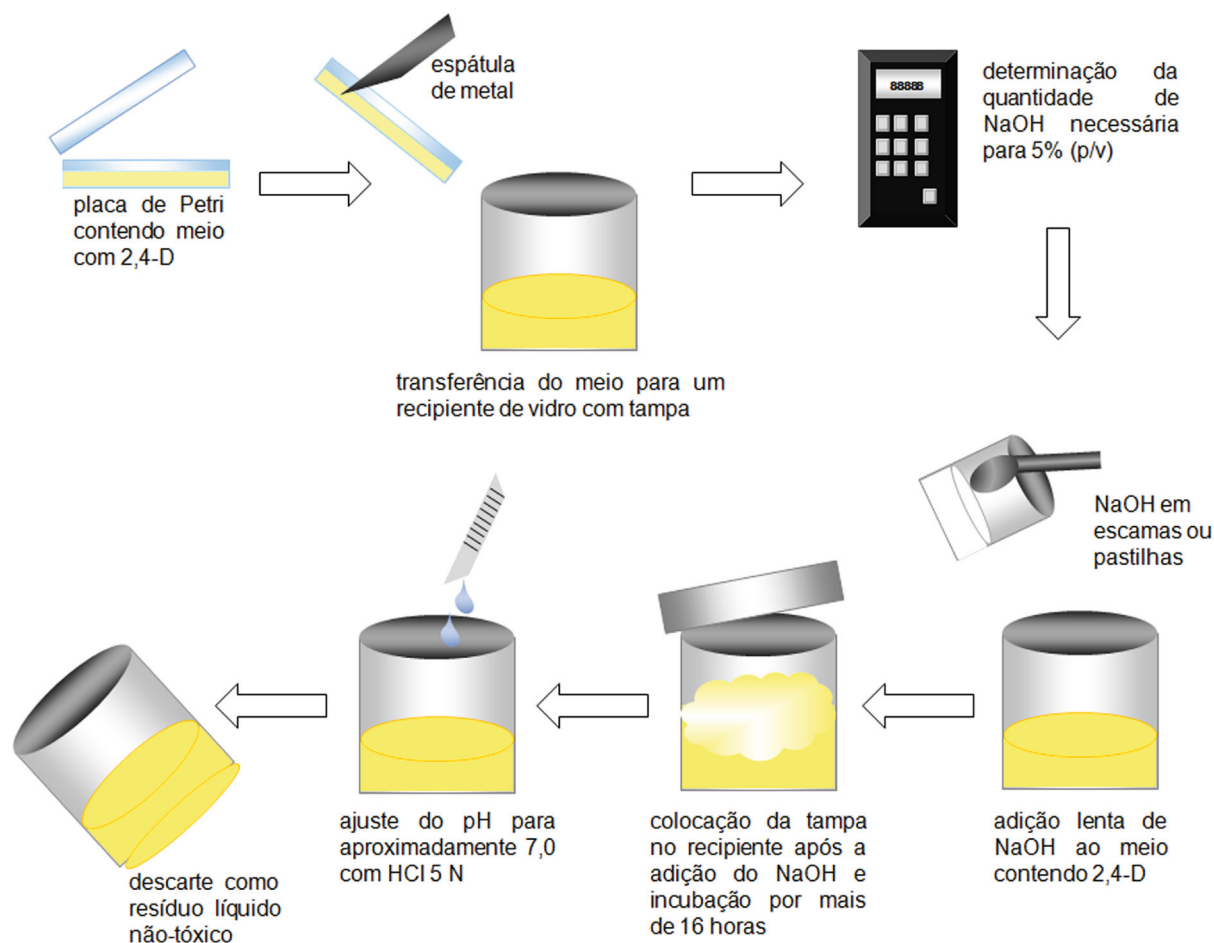


Fig. 6. Representação esquemática do protocolo de descontaminação de resíduos da auxina sintética 2,4-D de meios de cultura. O protocolo está detalhado no texto.

## B. Descontaminação de vidrarias e material plástico (Figura 7)

1. Remover completamente o meio de cultura, contendo 2,4-D de placas, frascos ou tubos, com auxílio de uma espátula;
2. O meio pode ser descontaminado conforme descrito em A;
3. Transferir os recipientes (placas, frascos ou tubos) para bacia de plástico polipropileno (PP) com tampa;
4. Calcular o volume de água necessário para cobrir o material a ser descontaminado. O volume pode ser determinado experimentalmente, empregando-se uma proveta graduada;
5. Pesar a quantidade de NaOH para uma solução final 5% (p/v) no volume total de água. Por exemplo: para 3 L de água será necessário usar 150 g de NaOH;  
 \*\* Caso utilize hidróxido de sódio (NaOH) para uso doméstico, a quantidade necessária para a descontaminação deverá ser corrigida de acordo com a pureza do produto comercial. Por exemplo: para um produto para uso doméstico com 87% de pureza, será necessário empregar 169,5 g para descontaminar 1,5 L de meio.
6. Em capela de exaustão, adicionar cuidadosa e lentamente o NaOH ao recipiente contendo a vidraria coberta de água;

7. Tampar o recipiente e incubar a temperatura ambiente por, pelo menos, 16 horas;
8. Após o período de incubação, a vidraria e os plásticos podem ser lavados, conforme procedimentos de rotina em laboratórios de cultura de tecidos, para a remoção dos resíduos de hidróxido de sódio;
9. Medir o pH da solução de lavagem e acrescentar lentamente uma solução HCl 5 N até que o pH final fique próximo de 7,0;
10. Após a neutralização do pH, a água de descontaminação pode ser descartada como resíduo inerte.

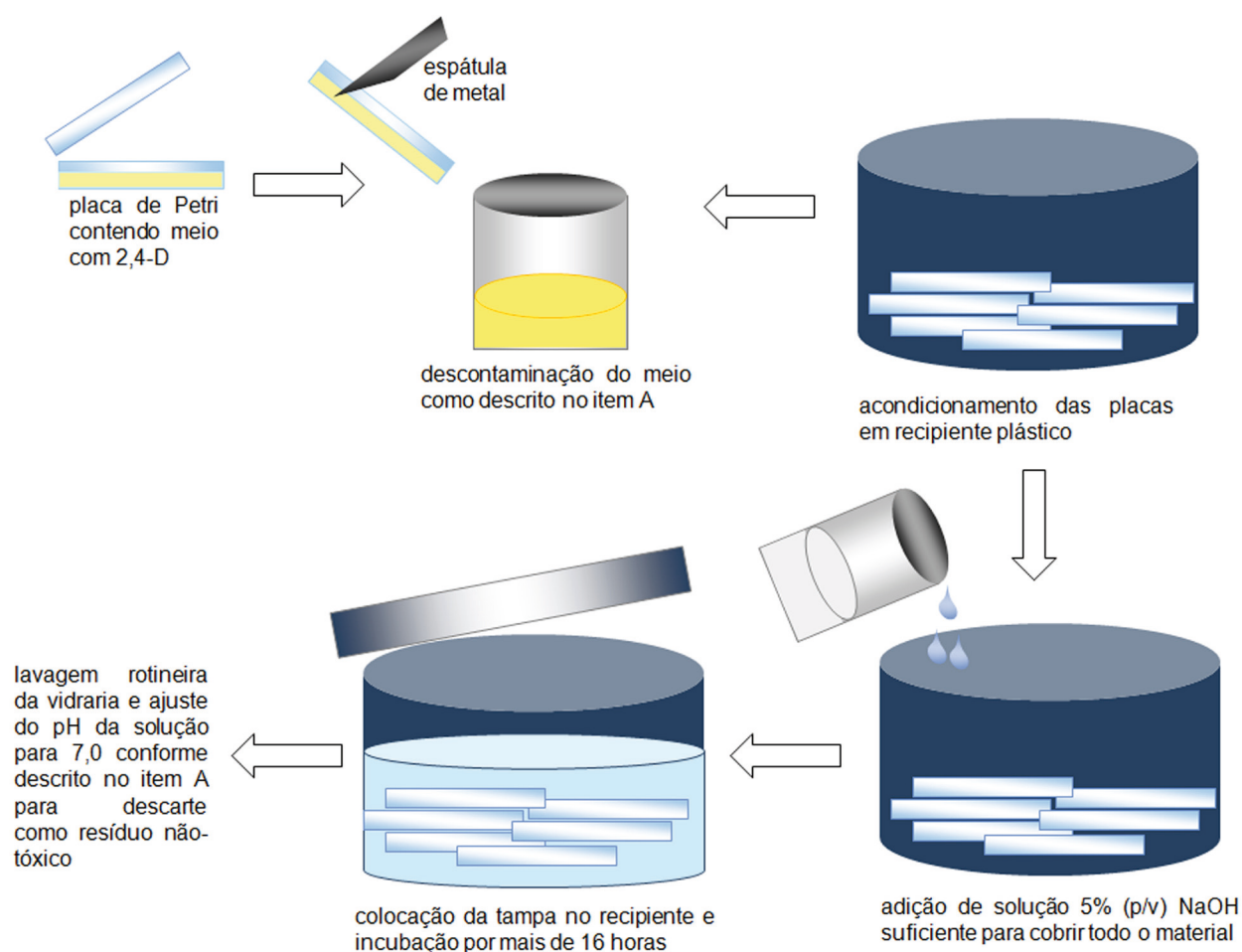


Fig. 7. Representação esquemática do protocolo de descontaminação de resíduos da auxina sintética 2,4-D de vidrarias e plásticos. O protocolo está detalhado no texto.

## Referências Bibliográficas

- ABRAMOFF, M. D.; MAGELHAES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, Pittsfield, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ARIAS, R.; FILICHKIN, S. A.; STRAUSS, S. H. Divide and conquer: development and cell cycle genes in plant transformation. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p. 267-273, 2006.
- BÉCAERT, V.; SAMSON, R.; DESCHÊNES, L. Effect of 2,4-D contamination on soil functional stability evaluated using the relative soil stability index (RSSI). **Chemosphere**, Amsterdam, v. 64, n. 11, p. 1713-1721, 2006.
- BEYL, C. A. Plant Tissue culture concepts and laboratory exercises. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. I. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC, 1999. p. 21-38.
- BOVEY, R. W.; YOUNG, A. L. **The science of 2, 4, 5-T and associated phenoxy herbicides**. New York: John Wiley and Sons, 1980. 462 p.
- BRAYBROOK, S. A.; HARADA, J. J. LECs go crazy in embryo development. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 13, n. 12, p. 620-624, 2008.
- CABRITO, T. R.; TEIXEIRA, M. C.; DUARTE, A. A.; DUQUE, P.; SÁ-CORREIA, I. Heterologous expression of a *Tpo1* homolog from *Arabidopsis thaliana* confers resistance to the herbicide 2,4-D and other chemical stresses in yeast. **Applied Microbiology and Biothecnology**, Heidelberg, v. 84, n. 5, p. 927-936, 2009.
- DAL BOSCO, D.; SINISKI, I.; RITSCHER, P. S.; QUECINI, V. Residues of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in plant-tissue culture glassware: their effects and a decontamination protocol. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, Delhi, v. 6, n. 4, p. 617-624, 2010.
- DUCLERCQ, J.; SANGWAN-NORREEL, B.; CATTEROU, M.; SANGWAN, R. S. *De novo* shoot organogenesis: from art to science. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 16, n. 11, p. 597-606, 2011.
- ESTELLE, M. A.; SOMERVILLE, C. Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 206, n. 2, p. 200-206, 1987.
- FAGLIARI, J. R.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S. de; CONSTANTIN, J. Impact of sublethal doses of 2,4-D, simulating drift, on tomato yield. **Journal of Environmental Sciences and Health - Part B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes**, London, v. 40, n. 1, p. 201-206, 2005.
- FENG, S.; JACOBSEN, S. E.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. **Science**, Washington, v. 330, n. 6004, p. 622-627, 2010.
- HANSON, J. B.; TREWAVAS, A. J. Regulation of plant cell growth: the changing perspective. **New Phytologist**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 1-18, 1982.
- HARDELL, L. Pesticides, soft-tissue sarcoma and non-Hodgkin lymphoma: historical aspects on the precautionary principle in cancer prevention. **Acta Oncologica**, London, v. 47, n. 3, p. 347-354, 2008.

- IOCCO, P.; FRANKS, T.; THOMAS, M. R. Genetic transformation of major wine grape varieties of *Vitis vinifera* L. **Transgenic Research**, New York, v. 10, n. 2, p. 105-112, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 90, n. 1, p. 1-8, 2007.
- PAZMIÑO, D. M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; SANDALIO, L. M. Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 1, n. 7, p. 3, 2012.
- PEIXOTO, F. P.; GOMES-LARANJO, J.; VICENTE, J. A.; MADEIRA, V. M. Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 165, n. 11, p. 1125-1133, 2008.
- RAGHAVAN, V. Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 91, n. 11, p. 1743-1756, 2004.
- RAHMAN, A. Auxin: a regulator of cold stress response. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 2012. No prelo. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.2012.01617.x/pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2012. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2012.01617
- RASBAND, W. S. **ImageJ**. Bethesda, USA: National Institutes of Health, 2012. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Acesso em: 2 out. 2012.
- SAVALDI-GOLDSTEIN, S.; BAIGA, T. J.; POJER, F.; DABI, T.; BUTTERFIELD, C.; PARRY, G.; SANTNER, A.; DHARMASIRI, N.; TAO, Y.; ESTELLE, M.; NOEL, J. P.; CHORY, J. New auxin analogs with growth-promoting effects in intact plants reveal a chemical strategy to improve hormone delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 105, n. 39, p. 15190-15195, 2008.
- SIMÕES, T.; TEIXEIRA, M. C.; FERNANDES, A. R.; SÁ-CORREIA, I. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, mediated by *Msn2p*- and *Msn4p*-regulated genes: important role of SPI1. **Applied and Environmental Microbiology**, Heidelberg, v. 69, n. 7, p. 4019-4028, 2003.
- SURA, S.; WAISER, M.; TUMBER, V.; FARENHORST, A. Effects of herbicide mixture on microbial communities in prairie wetland ecosystems: a whole wetland approach. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 435-436C, n. A1-A2, p. 34-43, 2012.
- VANSTRAELEN, M.; BENKOVÁ, E. Hormonal interactions in the regulation of plant development. **Annual Review in Cell Developmental Biology**, Palo Alto, v. 28, p. 463-487, 2012.
- VIDAL, J. R.; RAMA, J.; TABOADA, L.; MARTIN, C.; IBAÑEZ, M.; SEGURA, A.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 96, n. 1, p. 85-94, 2009.

WHO. **Data sheets on pesticides no. 37.** [S.l.]: WHO: FAO, 1978. VBC/DS/78.37.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 49-64, 2010.





---

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*  
Rua Livramento, 515 95700-000 Bento Gonçalves, RS  
Telefone (54) 3455-8000 Fax (54) 3451-2792  
<http://www.cnpuv.embrapa.br> . [sac@cnpuv.embrapa.br](mailto:sac@cnpuv.embrapa.br)

CGPE 10047



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

